

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19592053
 研究課題名（和文） 肝細胞増殖因子トランスジェニックマウスを用いた発癌機序の解析
 研究課題名（英文） Oncogenesis in HGF/SF transgenic mice
 研究代表者
 市川 武（ICHIKAWA TAKESHI）
 群馬大学・医学部・助教
 研究者番号：60420105

研究成果の概要:肝細胞増殖因子トランスジェニックマウスと癌抑制遺伝子である Arf、Ink4a、p53 それぞれのノックアウトマウスのダブルマウスを作成し、発生したメラノーマ、横紋筋肉腫を解析した。その結果、Arf-p53 経路の不活性化と横紋筋肉腫発癌との関連性を見いだした。一方で、p53 の不活性化とメラノーマ発癌とは関連を認めなかったのに対して、Arf の不活性化のメラノーマ発癌への関与が示された。このことは Arf が p53 を介しない経路でメラノーマ発癌の抑制をしている可能性を示唆した。Ink4a-RB 経路の不活性化はメラノーマ発癌に関与する一方で、横紋筋肉腫発癌への関与は認めなかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学、小児外科学

キーワード：横紋筋肉腫、メラノーマ、トランスジェニックマウス、癌抑制遺伝子

1. 研究開始当初の背景

横紋筋肉腫は3分の2が10歳未満の小児に好発する腫瘍であり、米国での報告では5年生存率は60%を超えているものの、発生部位、進行度、組織型によっては治療成績は未だ不良である。私達の肝細胞増殖因子(HGF/SF)トランスジェニックマウスは異所性の骨格筋形成を認め、生後早期(3.5日齢)に紫外線照射をした群では高率にメラノーマ発癌を認めた。またこのHGF/SFトランスジェニックマウスと各々別の癌抑制遺伝子であるInk4aとArfを同時にノックアウトした

Ink4a/Arfノックアウトマウスから作成されたダブルマウス(HGF/SF-transgenic Ink4a/Arf-/-マウス)では95%以上に横紋筋肉腫を発生し、紫外線を照射することにより高率にメラノーマを発癌し、横紋筋肉腫、メラノーマ発癌とInk4a、Arfの不活性化との関連が示唆された。

2. 研究の目的

これまでのHGF/SF-transgenic Ink4a/Arf-/-マウスでの検討ではInk4aとArfを同時に不活性化させており、Ink4aとArfのどちらの

遺伝子の不活性化が横紋筋肉腫、メラノーマの発癌に重要なのか、あるいは片方の遺伝子の不活性化のみでは発癌に不十分で両方の遺伝子の不活性化が必要なのか不明であった。今回の研究では Ink4a と Arf をそれぞれ単独でノックアウトした。この研究により横紋筋肉腫、メラノーマ発癌における Ink4a と Arf の役割の違いを明らかにしたい。

一方、Arf は p53 のシグナル伝達の上流に位置するが、近年、Arf が p53 に依存しない経路でも細胞周期に作用しているとの報告がされている。今回、我々は Arf と p53 の横紋筋肉腫、メラノーマの発癌への関与の違いについても検討する。

3. 研究の方法

HGF/SF の過剰発現を伴った Ink4a ノックアウトマウス (HGF/SF-transgenic Ink4a^{-/-}マウス)、Arf ノックアウトマウス (HGF/SF-transgenic Arf^{-/-}マウス)、p53 ノックアウトマウス (HGF/SF-transgenic p53^{-/-}マウス) における腫瘍の発生率と分子生物学的解析

(1) ダブルマウスの繁殖:

上記の各々のジェノタイプのダブルマウスを繁殖させ、横紋筋肉腫フリー累積生存率、横紋筋肉腫発生率の比較を行った。同様の検討をメラノーマに関しても実施した。

(2) 病理組織学的検討:

死亡したマウスに関しては全例において腫瘍の発生の有無を検討する。免疫染色も行い、病理組織学的に横紋筋肉腫、メラノーマの診断を行った。

(3) Arf, p53 のメラノサイトの増殖に対する影響:

① 新生児の Wild type マウス、Arf ノックアウトマウス、p53 ノックアウトマウスの皮膚から分離した各々の初代培養メラノサイトの増殖曲線を作成し、増殖能の違いを検討した。同時に Senescence-detection kit (Biovision, CA, USA) を使用して β -galactosidase (SA- β -gal 陽性細胞を染色し、老化細胞を検出した。

② Ink4a^{-/-}メラノサイト (Ink4aK0 メラノサイト)、p53 をノックダウンした Ink4aK0 メラノサイト (Ink4aK0/p53KD メラノサイト)、Ink4a-Arf^{-/-}メラノサイト (Ink4a-ArfK0 メラノサイト)、p53 をノックダウンした Ink4a-ArfK0 メラノサイト (Ink4a-ArfK0/p53KD メラノサイト) を培養し、増殖能を検討した。各々のメラノサイトにおける p53 のノックダウンは p53 に特

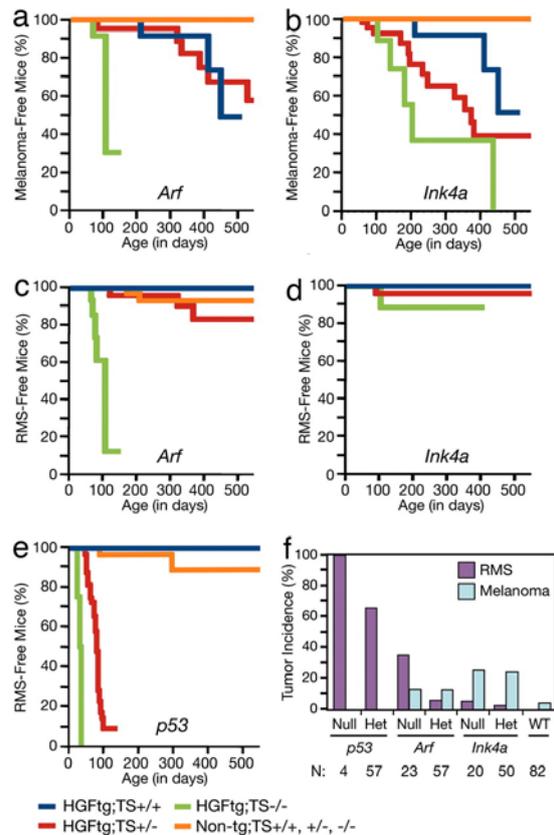
異的な microRNA を組み込んだレトロウイルスベクター

(LUMP-p52.1224) を用いて行った。また Ink4a-ArfK0 メラノサイト、Ink4a-ArfK0/p53KD メラノサイトにレトロウイルスベクターを用いて Arf を導入し、細胞増殖能の変化を検討した。

4. 研究成果

(1) HGF/SF トランスジェニックマウスにおける Arf, Ink4a, p53 の不活性化がメラノーマ、横紋筋肉腫発生に及ぼす影響

Fig. 1



TS: tumor suppressor, HGFtg:

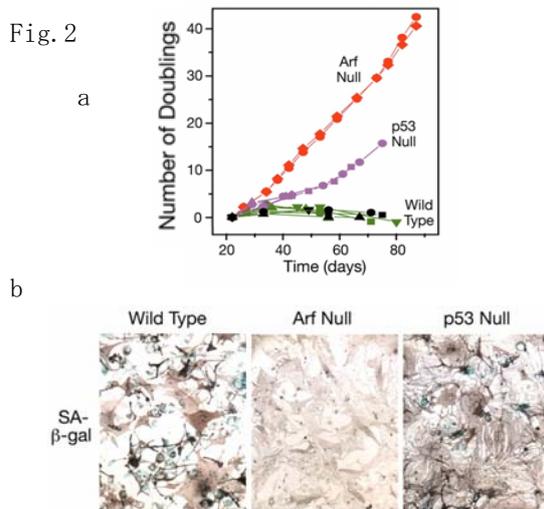
HGF/SF-transgenic, RMS: 横紋筋肉腫

新生児期に紫外線照射をした HGF/SF-transgenic Arf^{-/-}マウスは平均生後 3.5 か月、HGF/SF-transgenic Ink4a^{-/-}マウスは平均生後 7 か月でメラノーマを発生した (Fig. 1a, b)。一方で HGF/SF-transgenic Arf^{-/-}マウスは平均 3.7 か月で横紋筋肉腫を発生したが (Fig. 1c)、HGF/SF-transgenic Ink4a^{-/-}マウスでは横紋筋肉腫の発生は稀だった (Fig. 1d)。この結果は Arf-p53 経路が横紋筋肉腫の発癌抑制に重要な役割を担っていることを示唆した。このことは

HGF/SF-transgenic p53^{-/-}マウスでは生後平均 1.4 か月で、HGF/SF-transgenic p53^{+/-}マウスでは生後平均 2.7 か月という早期に横紋筋肉腫を発生することから裏打ちされた (Fig. 1e)。一方で HGF/SF-transgenic p53^{-/-}マウス、HGF/SF-transgenic p53^{+/-}マウスではともにメラノーマの発生を認めなかった (Fig. 1f)。この結果から Arf がメラノーマの発癌抑制に作用しているのに対して、p53 には明らかなメラノーマ発癌抑制作用を認めないことを示された。この事実は Arf が p53 とは別の経路でメラノーマ発癌抑制に作用していることを示した。

(2) Arf の不活性化がマウス初代培養メラノサイトの老化に及ぼす影響

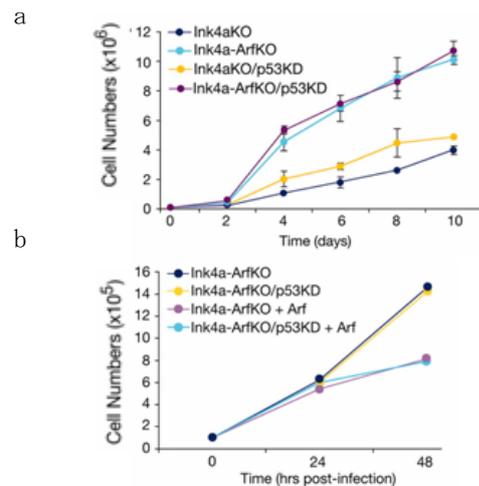
Fig. 2



Wild type のメラノサイトは培養開始後 4 週までに増殖を停止し、老化した。Arf null メラノサイトは 3 か月以上にわたって増殖を続けた。培養開始 50 日以降から p53 null メラノサイトの増殖能は回復を示し、その増殖率は Arf null メラノサイトと近似していた (Fig. 2a)。SA-β-gal 陽性細胞は Wild type メラノサイトと p53 null メラノサイトに観察された (Fig. 2b)。p53 が不活性化されたメラノサイト細胞株の melan-p53-1 の樹立は Ink4a の発現の消失を伴っていた。一方で継代を繰り返した melan-p53-1 は Arf 発現の消失と関連した増殖能の増強を示した。これらの結果から p53 の消失はメラノサイトの不老化には十分ではないことが示された。

(3) メラノサイトの増殖に Arf、p53 が及ぼす影響

Fig. 3



Arf の発現を欠損したメラノサイトは Arf の発現が維持されているメラノサイトより高い増殖能を示した。p53 の発現の有無で増殖能の違いは認めなかった (Fig. 3a)。Ink4a-ArfKO メラノサイト、Ink4a-ArfKO/p53KD メラノサイトに Arf を発現させたところ、細胞増殖は抑制された (Fig. 3b)。このことは p53 とは別の経路で Arf がメラノサイトの増殖を制御していることを示した。

以上の我々の結果から ARF は p53 と共通のシグナル伝達の経路に存在しているが、p53 を経路しない別の経路でも発癌を抑制していることが示された。このことは p53 を発現させることに基づいた治療デザインではメラノーマの治療には不十分であることを示しており、ARF が p53 とは別の経路で発癌抑制作用を及ぼしている他の悪性腫瘍においても当てはまることである。今後は横紋筋肉腫についてもその発癌機序について解析を進めていく予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 13 件)

- ① Takeshi Ichikawa, Hitoshi Takagi, Masatomo Mori. Abdominal Tuberculosis in the Absence of Pulmonary Involvement shown by 2-[Fluorine 18]Fluoro-2-Deoxy-D-Glucose Positron Emission Tomography, Clin Gastroenterol Hepatol, 2009 Feb 24, [Epub ahead of print] 「in press」 査読有
- ② Takeshi Ichikawa, Kyoichi Kaira, Shinsuke Oh-I (他 2 名, 1 番目), Serious complications after a proximal

- gastrectomy with a jejunal pouch interposition for gastric cancer, Clin J Gastroenterol, 2009, 「in press」, 査読有
- ③ Takeshi Ichikawa, Hiroko Sato, Kyoichi Kaira (他 5 名、1 番目), Prolonged intrahepatic cholestasis after exposure to loxoprofen, Clin Ther, 30, 2402-2406, 2008, 査読有
- ④ Ken Sato, Hitoshi Takagi, Takeshi Ichikawa (他 2 名、3 番目), Emerging Therapeutic Strategies for Hepatitis C Virus Infection, Current Molecular Pharmacology, 1, 130-150, 2008, 査読有
- ⑤ Satoru Kakizaki, Daichi Takizawa, Takeshi Ichikawa (他 6 名、5 番目), Nonalcoholic fatty liver disease in Japanese patients with severe obesity who received laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass surgery (LRYGB) in comparison to non-Japanese patients. J Gastroenterol, 43, 86-92, 2008, 査読有
- ⑥ 高木 均、佐藤 賢、市川 武 (他 20 名、3 番目)、混合型肝癌 10 例の臨床病理学的検討、Liver Cancer、14 巻、190-198、2008、査読有
- ⑦ 大山達也、蒔田富士夫、市川 武 (他 6 名、5 番目)、肝細胞癌初発治療後 10 年以上生存例の検討、Liver Cancer, 14 巻、48-53、2008、査読有
- ⑧ Takeshi Ichikawa, Oh-I Shinsuke, Kyoichi Kaira (他 4 名、1 番目), Multifocal nodular hepatic steatosis associated with the metabolic syndrome, J Gastroenterol Hepatol, 18, 127, 2007, 査読有
- ⑨ Satoshi Hagiwara, Toshiyuki Otsuka, Takeshi Ichikawa (他 7 名、6 番目), Overexpression of NK2 promotes liver fibrosis in carbon tetrachloride-induced chronic liver injury, Liver International, 28, 126-131, 2007, 査読有
- ⑩ Yuichi Yamazaki, Satoru Kakizaki, Takeshi Ichikawa (他 4 名、4 番目), Interstrain differences in susceptibility to non-alcoholic steatohepatitis, J Gastroenterol Hepatol, 23, 276-282, 2007, 査読有
- ⑪ Kyoichi Kaira, Hidetoshi Yasuoka, Takeshi Ichikawa (他 4 名、3 番目), Descending necrotizing mediastinitis after upper gastrointestinal endoscopy, Endoscopy, 39, E29, 2007, 査読有
- ⑫ Takeshi Ichikawa, Linan Ha, Miram Anver (他 8 名、1 番目), ARF function as a melanoma tumor suppressor by inducing p53-independent senescence, Proc Natl Acad Sci USA, 104, 10968-10973, 2007, 査読有
- ⑬ 柴 慎太郎、柿崎 暁、市川 武 (他 9 名、4 番目)、原発性胆汁性肝硬変における Health related quality of life 日本語版 PBC-40 問診票を用いた検討、肝臓、48 巻、256-263、2007、査読有
- [学会発表] (計 23 件)
1. 今泉 淳、慢性リンパ性白血病薬フルタラビンにより reactivation を起こした B 方肝炎の 1 例、第 561 回日本内科学会関東地方会、2009. 3. 14、東京
 2. 柿崎 暁、消化管静脈瘤の診断治療戦略異所性静脈瘤の検討、第 87 回日本消化器内視鏡学会関東地方会、2008. 12. 12、東京
 3. 長沼 篤、群馬県における E 型肝炎、第 37 回日本肝臓学会東部会、2008. 12. 4、東京
 4. 橋爪洋明、C 型慢性肝炎への IFN 治療 SVR から約 9 年の経過で肥満の悪化と糖尿病を発症し、組織学的に線維化の進行を認めた NASH の 1 例、第 37 回日本肝臓学会東部会、2008. 12. 4、東京
 5. 佐藤 賢、性差からみた Nonalcoholic steatohepatitis の臨床病理学的検討、第 50 回日本消化器病学会大会、2008. 10. 2、東京
 6. 儀保順子、結腸への腹腔内リンパ節の癒着より下血を来した肺癌の 1 例、第 556 回日本内科学会関東地方会、2008. 9. 6、東京
 7. 北川史子、SLAIgG 抗体陽性の自己免疫性肝炎にレボチロキシナトリウムによる薬剤性肝障害を合併した 1 例、第 554 回日本内科学会関東地方会、2008. 6. 14、東京
 8. 湯浅和久、Stevioside の C 型肝炎に対する新規抗ウイルス薬としての可能性、第 44 回日本肝臓学会総会、2008. 6. 6、松山
 9. 佐藤 賢、B 型慢性肝疾患に対する Entecavir 単独療法及び Adefovir dipivoxil との併用療法の有用性、第 44 回日本肝臓学会総会、2008. 6. 6、松山
 10. 高木 均、薬物性肝障害重症型の推移、第 44 回日本肝臓学会総会、2008. 6. 6、松山
 11. Satoru Kakizaki, Quality of Life in Patients with Primary Biliary Cirrhosis Using a Japanese Version of the PBC-40 Questionnaire, Digestive

- Disease Week 2008, May 18, 2008, San Diego, USA.
12. Satoru Kakizaki, Non Alcoholic Fatty Liver Disease in Japanese Patients with Severe Obesity Who Received Laparoscopic Roux-en-Y Gastric Bypass Surgery (LRYGB) in Comparison to Non-Japanese Patients, Digestive Disease Week 2008, May 18, 2008, San Diego, USA.
 13. 橋爪洋明、NAFLD の線維化進行度別予後、第 94 回日本消化器病学会総会、2008. 5. 9、福岡
 14. 柿崎 暁、原発性胆汁性肝硬変における Health related quality of life (HRQOL)、第 105 回日本内科学会講演会、2008. 4. 12、東京
 15. 本城裕章、2 度の下大静脈ステントが著効した進行性肝細胞癌による二次性 Budd-Chiari syndrome の 1 例、第 552 回日本内科学会関東地方会、2008. 3. 8、東京
 16. 市川 武、群馬県における 1 型高ウイルス量の C 型慢性肝炎に対するペグインターフェロン α -2a/リバビリン併用療法について、第 2 回 Hepatitis C Forum in 群馬、2008. 2. 26、前橋
 17. 大山裕亮、FDG-PET で発見された腸結核の 1 例、第 550 回日本内科学会関東地方会、2007. 12. 9、東京
 18. 高木 均、Vitamin E、K 併用による肝癌抑制の検討、第 11 回日本肝臓学会大会、2007. 10. 19、神戸
 19. 戸島洋貴、Lmivudine 投与例を含む B 型急性肝炎自験例の検討、第 11 回日本肝臓学会大会、2007. 10. 18、神戸
 20. 岩本敦夫、Pneumocystis 肺炎を合併した ACTH 依存性 Cushing 症候群の 1 例、第 547 回日本内科学会関東地方会、2007. 9. 8、東京
 21. Takeshi Ichikawa, Disruption of the Arf/p53 pathway promotes rhabdomyosarcoma in transgenic mice overexpressing hepatocyte growth factor/scatter factor, Digestive Disease Week 2007, May 22, 2007, Washington DC, USA.
 22. 田中良樹、胆管 tube stent の抜去に難渋した急性胆管炎の 1 例、第 73 回日本消化器内視鏡学会総会、2007. 5. 10、東京
 23. 市川 武、群馬県における 1 型高ウイルス量の C 型慢性肝炎に対するペグインターフェロン α -2a/リバビリン併用治療の進行状況、第 1 回 Hepatitis C Forum in 群馬、2007. 4. 18、前橋

6. 研究組織

(1) 研究代表者

市川 武 (ICHIKAWA TAKESHI)
群馬大学・医学部・助教
研究者番号：60420105

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：